

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-171988

(43)Date of publication of application : 18.06.2002

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
C12Q 1/68

(21)Application number : 2000-374098

(71)Applicant : SANGAKU RENKEI KIKO
KYUSHU:KK

(22)Date of filing : 08.12.2000

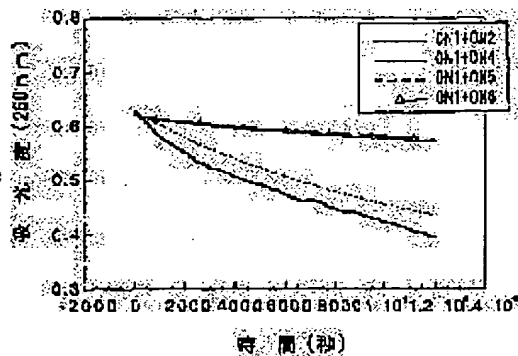
(72)Inventor : GOTO MASAHIRO
BOKU RENSHUN
FURUSAKI SHINTARO

(54) METHOD FOR DETECTING ABNORMAL GENE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a new technique that permits simply and sensitively detecting an abnormal gene for the gene diagnosis.

SOLUTION: This method for detecting an abnormal gene comprises the steps of hybridizing a probe having a base sequence complementary to a base sequence of a normal gene to a nucleic acid oligomer having the base sequence of the normal gene in a reversed micelle, hybridizing a probe complementary to the base sequence of an abnormal gene having a mutation in a part of the base sequence to a nucleic acid oligomer having the base sequence of the above normal gene in another reversed micelle, and examining any difference in the rates of these hybridization reaction, for example, by determining the change in the absorbance in the UV region.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's

"

decision of rejection]

[Date of extinction of right]

*NOTICES *

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.**** shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The detection approach of the abnormality gene characterized by to carry out hybridization of the probe which has a complementary base sequence to this base sequence, to carry out hybridization of the complementary probe to the base sequence of the abnormality gene with which this a part of base sequence varied to the nucleic-acid oligomer which has the base sequence of said normal gene in still more nearly another reversed micelle, to measure the rate of these hybridization reactions in reversed micelle to the nucleic-acid oligomer which has the base sequence of a normal gene, and to investigate the difference.

[Claim 2] The detection approach of the abnormality gene of claim 2 characterized by pouring in the nucleic-acid oligomer which has the base sequence of a normal gene into reversed micelle, pouring the probe which has a complementary base sequence into the base sequence of the probe which has a complementary base sequence in the base sequence of a normal gene in the still more nearly same reversed micelle, or an abnormality gene, and making a hybridization reaction perform.

[Claim 3] The detection approach of the abnormality gene of claim 1 characterized by measuring the rate of a hybridization reaction by measuring change of the absorbance in an ultraviolet region, or claim 2.

[Claim 4] The detection approach of the abnormality gene of claim 3 characterized by measuring the absorbance in 260nm.

[Translation done.]

*NOTICES *

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the new approach for detecting an abnormality gene.

[0002]

[Description of the Prior Art] The Human Genome Project started to the end of the 1980s also greets termination at the beginning of the 21st century, and while all the base sequences of the Homo sapiens who attains to 3 billion are determined, the gene said to be about 100,000 pieces which Homo sapiens has is clarified. Thus, if the gene in connection with various living body functions is solved in in the living body [leading to a hereditary disease / many genes or in the living body], the abnormality will be detected, the illness will be predicted and the gene diagnosis which can be reflected in the prevention and therapy will become still more important.

[0003] The approach mainly adopted as gene diagnosis from before tends to carry out hybridization of the probe (oligonucleotide) corresponding to each gene to a normal gene and an abnormality gene, tends to analyze the result by gel electrophoresis, and tends to detect an abnormality gene. However, since this approach needs to label a probe with radioisotope, a fluorochrome, an enzyme, etc., actuation is complicated and there are many disadvantageous points in respect of safety, cost, automation, etc. Moreover, although a hybridization reaction is performed underwater and it depends for the reaction rate on the concentration of DNA in a water solution etc., in the conventional approach, hybridization is not necessarily performed at the reaction place which can control a reaction rate to advance a reaction the optimal.

Therefore, the gene sample and probe which are used had a limit, and the conventional approach had a fault -- detection sensitivity is also restricted.

[0004]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] The purpose of this invention is to offer the technique new type [with which it is used for gene diagnosis] which is simple and can detect an abnormality gene to high sensitivity.

[0005]

[Means for Solving the Problem] this invention person found out that the above-mentioned purpose could be attained by incorporating an object gene and its probe in reversed micelle, making reversed micelle into the reaction place of those hybridization, and acting as the monitor of the rate of a hybridization reaction, as a result of repeating research.

[0006] This invention makes this base sequence carry out hybridization of the probe which has a complementary base sequence to the nucleic-acid oligomer which has the base sequence of a normal gene in reversed micelle in this way. In another reversed micelle to; pan To the nucleic-acid oligomer which has the base sequence of said normal gene hybridization of the complementary probe is carried out to the base sequence of the abnormality gene to which this a part of base sequence varied -- making --; -- the detection approach of the abnormality gene which consists of measuring the rate of these hybridization reactions and investigating the difference is offered.

[0007] The nucleic-acid oligomer which has the base sequence of a normal gene in reversed

micelle is poured in, the probe which has a complementary base sequence is poured into the base sequence of the probe which has a complementary base sequence in the base sequence of a normal gene in the still more nearly same reversed micelle, or an abnormality gene, and a hybridization reaction is made to perform in the desirable mode of the approach of this invention.

[0008] In the approach of this invention, by measuring change of the absorbance in an ultraviolet region, it is desirable to measure the rate of a hybridization reaction and it is desirable to measure the absorbance in 260nm especially.

[0009]

[Embodiment of the Invention] The approach of this invention makes the interior of the reversed micelle which is a nano molecular assembly the reaction place of the hybridization of a nucleic acid, and detects an abnormality gene by measuring the reaction rate. The dynamical detecting method of a gene for using such reversed micelle is an unprecedented, completely new approach, and is based on the following detection principles.

[0010] (1) The thing which has the high complementarity of a mutual base sequence advances more quickly, and the hybridization of a nucleic acid forms a hybrid. Therefore, if a mismatch is in a base pair, the rate of hybridization and hybrid thermal stability will fall, and this fall will be dependent on the number of the mismatches in a base pair, and the location of a mismatch. In this way, if this invention is followed, by measuring the rate of the hybridization of an abnormality gene and a normal gene in reversed micelle, the number and location (part) of a mismatch which are included in the abnormality gene can be evaluated, and it will become detectable [an abnormality gene].

[0011] (2) In this invention, since the reaction place of the hybridization of a nucleic acid is moved into reversed micelle, the rate of hybridization is controllable the optimal by changing the particle size (magnitude) of reversed micelle, a number, the formation format of reversed micelle, etc.

[0012] (3) Since a nucleic acid is condensed in a micell, in the usual water medium, in a micell, the hybridization of it becomes possible and the high sensitivity detection of an abnormality gene of it is attained also under the thin conditions which cannot form hybrid.

[0013] In enforcing the approach of this invention based on the principle like the above, this base sequence is made to carry out hybridization of the probe (oligonucleotide) which has a complementary base sequence to the nucleic-acid oligomer (oligonucleotide) which has the base sequence of a normal gene in reversed micelle. Furthermore, hybridization of the complementary probe (oligonucleotide) is carried out to the base sequence of the abnormality gene with which this a part of base sequence varied to the nucleic-acid oligomer (oligonucleotide) which has the base sequence of said normal gene in another reversed micelle. And an abnormality gene is detected by measuring the rate of these hybridization reactions and investigating the difference.

[0014] Here, reversed micelle is a molecular assembly by which self-formation is carried out in an organic medium at high order, and is an almost spherical molecular assembly with which a surfactant molecule carries out a non-dense water space outside (organic solvent side) by carrying out the hydrophilic part (the functional group or atomic group of a hydrophilic property) inside, and is specifically formed in an organic solvent as known well.

[0015] Hybridization in the inside of such reversed micelle can be performed in some formats. For example, hybridization is advanced within the reversed micelle in which both reversed micelles are formed by uniting by mixing the reversed micelle which poured in the nucleic-acid oligomer which has the base sequence of a normal gene, and the reversed micelle which poured into this base sequence the probe which has a complementary base sequence. Hybridization is advanced within the reversed micelle in which both reversed micelles are formed by uniting by mixing the reversed micelle which similarly poured in the nucleic-acid oligomer which has the base sequence of a normal gene, and the reversed micelle which poured the complementary probe into the base sequence of the abnormality gene to which this a part of base sequence varied. And the reaction rate of the hybridization in the inside of such reversed micelles is measured, and the difference is investigated. Although this approach is effective in detecting the existence or nonexistence of the mismatch based on an abnormality gene, judging even the

location of a mismatch generally takes time amount (the example 2 below-mentioned reference). [0016] Then, if the desirable mode of this invention is followed, the nucleic-acid oligomer which has the base sequence of a normal gene will be poured in into reversed micelle, and the probe which has a complementary base sequence in the still more nearly same reversed micelle at the base sequence of a normal gene will be poured in. Similarly the nucleic-acid oligomer which has the base sequence of a normal gene in another reversed micelle is poured in, and the probe which has a complementary base sequence in the still more nearly same reversed micelle at the base sequence of an abnormality gene is poured in. And hybridization is made to perform in such reversed micelles, a reaction rate is measured, and the difference is investigated. According to this approach, since an oligonucleotide contacts directly, a hybridization rate of reaction increases, and it becomes possible to detect to the location of not only the existence or nonexistence of a mismatch but a mismatch (the example 3 below-mentioned reference).

[0017] Impregnation to the nucleic-acid oligomer of a normal gene or the reversed micelle of a probe is performed in the state of the water solution melted into the buffer liquid adjusted so that it might have pH and ionic strength which approximate those oligonucleotides under a physiological condition. or [moreover, / that a probe complementary to the base sequence of an abnormality gene presents high alkalinity with the nucleic acid of the double strand used as the candidate for detection as known well] — or it is obtained by considering as the nucleic acid of a single strand by heating.

[0018] In addition, although the target nucleic acid [this invention] is generally DNA, it can apply this invention also to analysis of the gene which consists of RNA like mRNA. Therefore, the word of the hybridization used about this invention shall contain not only when a DNA-DNA hybrid is formed, but the hybridization of DNA and RNA or the hybridization of RNA and RNA.

[0019] The surfactant used in order to form reversed micelle in this invention will not be limited especially if spontaneous formation of the molecular assembly which was mentioned above in the organic solvent can be carried out, but a hydrophilic part can also use any of the surfactant of ionicity (anionic, cationicity, or both sexes), or a nonionic surfactant. However, since nucleic acids, such as DNA, are anionic, it is desirable to use an anionic surfactant from a nucleic acid opposing with the wall of reversed micelle, and not adhering to this wall, but hybridization progressing smoothly. Although an others and dioleoyl phosphoric acid, dodecyl sulfonic-acid sodium, such mixture, etc. are mentioned to forming reversed micelle, it is not restricted to these. [sodium succinate / which is known as an example of a desirable surface active agent as AOT which is an anionic surface active agent / G 2-ethylhexyl sulfo] Moreover, as an example of an organic solvent desirable as a medium by which the reversed micelle which consists of these surfactants is formed, although an isooctane, a hexane, a cyclohexane, a dodecane, toluene, chloroform, etc. are mentioned, it is not restricted to these.

[0020] In this invention, the above surfactants are used as W_o (mole ratio of water/surfactant) at a rate which is generally set to 5-50. W_o is a numeric value which governs the magnitude (particle size) of reversed micelle, and it is so desirable that the oligonucleotide which carries out hybridization is long to make reversed micelle to which W_o becomes large form.

[0021] Although the approach of this invention is suitable for carrying out hybridization of the oligonucleotide which consists of the base of 15-50 generally, and detecting an abnormality gene, it can apply this invention also to an oligonucleotide (for example, 100 bases) longer than this.

[0022] Although it can be measured using a means (ultraviolet spectroscopy equipment), for example, UV equipment, by which a structural change of the nucleic acid by hybridization is detectable, CD equipment (circular dichroism spectrum measuring device), DSC equipment (differential scan calorimetric analysis equipment), etc., since the rate of reaction of the hybridization in the inside of reversed micelle can know the structural change by hybridization easily that it is easy to deal with it, it is desirable to measure change of the absorbance in an ultraviolet region using UV equipment. Measurement of the absorbance in an ultraviolet region can know advance of a hybridization reaction qualitatively by measuring the absorbance in 260nm and observing aging of the absorbance. Moreover, what is necessary is just to search for relative initial velocity from the inclination of the plot of an absorbance to hybridization reaction time, in order to evaluate the rate of reaction of hybridization quantitatively.

[0023]

[Example] This invention is not restricted by these examples, although an example is shown below in order to clarify the description of this invention still more concretely.

Example 1: In order to determine the Measuring condition in the detection approach of the abnormality gene of preliminary experiment this invention, the hybridization behavior in the inside of a water solution was examined beforehand.

(1) Hybridization of the full match DNA and Mismatch DNA was performed using the synthetic oligonucleotide (it may only be hereafter described as a nucleotide or ON) of 20 bases which have the array shown below in sample DNA. In addition, epsilon is an absorbancy index in 260nm.

p53 antioncogene (normal gene)

Nucleotide 1:5'-GCTTTGAGGTGCGTGTGGT-3' (array number: 1) (epsilon183100 M_{cm}-1)

Probe nucleotide 2:5'-CGAAACTCCACGCACAAACA-3' with p53 antioncogene and a complementary array (array number: 2) (epsilon197300 M_{cm}-1)

Abnormality gene nucleotide 3:5'-CGAAACTCCACGAACAAACA-3' (array number: 3) (epsilon203100 M_{cm}-1) which has variation in the 13th place of p53 antioncogene

Nucleotide 4:5'-CGAAACTCCACGTACAAACA-3' (array number: 4) (epsilon200600 M_{cm}-1)

Abnormality gene nucleotide 5:5'-TGAAACTCCACGCACAAACA-3' which has variation in the 1st place of p53 antioncogene (array number: 5) (epsilon198300 M_{cm}-1)

Abnormality gene nucleotide 6:5'-CGAAACCCCACGCACAAACA-3' which has variation in the 7th place of p53 antioncogene (array number: 6) (epsilon196400 M_{cm}-1)

[0024] In order to check the secondary structure of these oligonucleotides, when the minimum free energy (Minimum Free Energy) was calculated with the minimum stacking length (Minimum Stacking Length) from each array, it checked that these oligonucleotides formed the single strand usual in the inside of a water solution from the result as shown below.

Nucleotide 1:minimum stacking length: — 2; The minimum free energy : 0.29 Kcal/mol nucleotide

2: minimum stacking length: — 2; minimum free-energy: — 1.59 Kcal/mol nucleotide 3:minimum

stacking length: — 2; minimum free-energy: — 1.59 Kcal/mol nucleotide 4:minimum stacking

length: — 2; minimum free-energy: — 1.59 Kcal/mol nucleotide 5:minimum stacking length: — 2;

minimum free-energy: — 1.90 Kcal/mol nucleotide 6:minimum stacking length: — 2; minimum

free-energy: — 1.59 Kcal/mol [0025] (2) Effect of temperature to a hybridization rate : they are

10mM Tris, 1mM EDTA (2Na), 100mM NaCl, and 2.017microM as a DNA sample of

complementary full match hybridization mutually. A nucleotide 1, 2.057microM Time amount

change of the absorbance in 260nm was measured changing measurement temperature into 25,

15, 10, 15, 25, 35, and 65 or 25 degrees C using the sample which consists of a nucleotide 2 and

pH7.0. The result is shown in drawing 1 . Since the absorbance in 260nm was smaller as were

shown in drawing 1 , and temperature was low, it turned out that this hybridization reaction is

early performed, so that temperature is low. Based on this result, the ease of actuation was also

taken into consideration and it decided to set future hybridization reaction temperature as 15

degrees C.

[0026] (3) Effect of the univalent cation concentration in a hybridization rate : in the

measurement temperature of 15 degrees C, it measured 1ml of absorption spectrums of a 200 to

800nm field at a time, using respectively the sample A shown below, Sample B, Sample C, and

Sample D.

Sample A: 10mM Tris, 1mM EDTA (2Na), 700mM NaCl, The 1.75microM nucleotide 1, 1.75microM

nucleotide 2 pH7.0 sample B:10mM Tris, 1mM EDTA (2Na), 700mM NaCl, the 1.75microM

nucleotide 1, 1.75microM nucleotide 4 pH7.0 sample C:10mM Tris, 1mM EDTA (2Na), 700mM

NaCl, the 1.75microM nucleotide 1, 1.75microM nucleotide 5 pH7.0 sample D:10mM Tris, 1mM

EDTA (2Na), 700mM NaCl, the 1.75microM nucleotide 1, 1.75microM nucleotide 6 pH7.0 [0027]

The result is shown in drawing 2 . As shown in drawing 2 , when a univalent sodium cation

recognizes 700mM existence, as for ON1+ON2 which is the full match DNA, and ON1+ON4 which

is Mismatch DNA, ON1+ON5 and ON1+ON6, the absorbance is similar and each does not not

much have change in the absorbance at the time of a single strand condition. From now on,

under the above-mentioned conditions, it turned out that the univalent cation concentration with

a very slow and hybridization reaction does not almost have the effect of the hybridization reaction rate on [under the above-mentioned conditions].

[0028] If considered as the factor which affects a hybridization reaction, existence of the organic solvent which pH of the buffer (interior of reversed micelle) which melts an oligonucleotide, and reversed micelle form etc. could be considered, but the approach of this invention was use to gene diagnosis, and since it was premised on the research under physiology conditions, it was made not to inquire about change [of pH] and organic solvent's existence effect.

[0029] Example 2: After the example of hybridization ** by fusion between reversed micelles carries out microinject of the oligonucleotide of a complementary array or a mismatch array to two reversed micelles, respectively, it makes hybridization perform within the reversed micelle which was made to mix and unite two reversed micelles and was obtained, and detects an abnormality gene.

[0030] (1) Formation of reversed micelle : 54microl impregnation of 10mM Tris, 1mM EDTA (2Na), pH7.0, and 198.043microM nucleotide 1 solution (aqueous phase) was done, and the reversed micelle of $W_o=20$ was made to form in 50mM AOT / 3ml (organic phase) of isooctane solutions (sample A). Similarly, as shown in the following table 1, sample B-E was prepared.

[0031]

[Table 1]

	有 機 相	水 相	見かけの DNA 濃度
サンプルA	界面活性剤 AOT 50 mM 溶媒 イソオクタン	10 mM Tris, 1mM EDTA(2Na), pH7.0, 198.0μM ヌクレオチド1	3.500μM
サンプルB	界面活性剤 AOT 50 mM 溶媒 イソオクタン	10 mM Tris, 1mM EDTA(2Na), pH7.0, 198.0μM ヌクレオチド2	3.500μM
サンプルC	界面活性剤 AOT 50 mM 溶媒 イソオクタン	10 mM Tris, 1mM EDTA(2Na), pH7.0, 198.0μM ヌクレオチド4	3.500μM
サンプルD	界面活性剤 AOT 50 mM 溶媒 イソオクタン	10 mM Tris, 1mM EDTA(2Na), pH7.0, 198.0μM ヌクレオチド5	3.500μM
サンプルE	界面活性剤 AOT 50 mM 溶媒 イソオクタン	10 mM Tris, 1mM EDTA(2Na), pH7.0, 198.0μM ヌクレオチド6	3.500μM

[0032] (2) Measurement : sample A1ml was put into the cel of UV equipment, the absorption spectrum of a 200 to 800nm field was measured in the measurement temperature of 15 degrees C, and it was shown in drawing 3 . Consequently, the absorption spectrum (absorbance) when pouring in a nucleotide 1 into reversed micelle was not different from the inside of a water solution. An oligonucleotide not denaturalizing but being incorporated by homogeneity in a micell in the reversed micelle of this condition, from now on, is understood.

[0033] Mixed sample A0.5ml and sample B0.5ml (full match), the hybridization reaction was made to start in 15 degrees C, and time amount change measurement with an absorbance of 260nm was immediately performed after initiation. Time amount change measurement of an absorbance was performed carrying out a hybridization reaction in 15 degrees C by the same approach using sample A+ sample C; sample A+ sample D; sample A+ sample E. The result is collectively shown in drawing 4 .

[0034] (3) Result consideration : as shown in drawing 4 , as a result of pursuing a hybridization reaction for 12000 seconds, ON1+ON2 whose base sequence of an oligonucleotide is a completely complementary full match mutually has a far early hybridization rate compared with ON1+ON4 which is a mismatch, ON1+ON5, and ON1+ON6. That is, although a lot of hybrids were formed in ON1+ON2 which is a full match when advancing a hybridization reaction for 12000 seconds, the case of the mismatch to which a mismatch exists in one place of 20 bases is not yet enough as hybrid formation. Thus, there was a difference with a full match and a mismatch remarkable in aging of an absorbance, in the above-mentioned hybridization reaction time (12000 seconds), in ON1+ON4 with a different mismatch part, ON1+ON5, and ON1+ON6, the difference was similar, and that a mismatch exists did not reach to detection of a mismatch part, although it was detectable.

[0035] Example 3: The example of hybridization ** by direct contact of an oligonucleotide shows the example which detects an abnormality gene by performing a hybridization reaction, carrying out microinject of the oligonucleotide with this array, a complementary array, or a mismatch array further, and contacting both oligonucleotides directly, after carrying out microinject of one kind of oligonucleotide to one reversed micelle.

[0036] (1) Formation of reversed micelle : 9microl impregnation of 10mM Tris, 1mM EDTA (2Na), pH7.0, and 198.0microM nucleotide 1 solution (aqueous phase) was done, and the reversed micelle of $W_o=10$ was made to form in 50mM AOT / 1ml (organic phase) of isooctane solutions. To this, 9 moremicrol impregnation of 10mM Tris, 1mM EDTA (2Na), pH7.0, and 198.0microM nucleotide 2 solution was done, finally the reversed micelle (sample A) of $W_o=20$ was prepared, and it used for measurement immediately at it. Measurement temperature is 15 degrees C. It measured by similarly preparing sample B-D as shown in the next table 2.

[0037]

[Table 2]

	サンプル A	サンプル B	サンプル C	サンプル D
有機相	界面活性剤 AOT 50 mM 溶媒 イソオクタン	界面活性剤 AOT 50 mM 溶媒 イソオクタン	界面活性剤 AOT 50 mM 溶媒 イソオクタン	界面活性剤 AOT 50 mM 溶媒 イソオクタン
水相/ $W_o=10$	10 mM Tris, 1mM EDTA (2Na), pH7.0, 198.0 μ M ヌクレオチド1	10 mM Tris, 1mM EDTA (2Na), pH7.0, 198.0 μ M ヌクレオチド1	10 mM Tris, 1mM EDTA (2Na), pH7.0, 198.0 μ M ヌクレオチド1	10 mM Tris, 1mM EDTA (2Na), pH7.0, 198.0 μ M ヌクレオチド1
見かけの DNA 濃度	ヌクレオチド1 - 1.765 μ M	ヌクレオチド1 - 1.765 μ M	ヌクレオチド1 - 1.765 μ M	ヌクレオチド1 - 1.765 μ M
添加剤/ $W_o=20$	10 mM Tris, 1mM EDTA (2Na), pH7.0, 198.0 μ M ヌクレオチド2	10 mM Tris, 1mM EDTA (2Na), pH7.0, 198.0 μ M ヌクレオチド4	10 mM Tris, 1mM EDTA (2Na), pH7.0, 198.0 μ M ヌクレオチド5	10 mM Tris, 1mM EDTA (2Na), pH7.0, 198.0 μ M ヌクレオチド6
見かけの DNA 濃度	ヌクレオチド1 - 1.760 μ M ヌクレオチド2 - 1.750 μ M	ヌクレオチド1 - 1.750 μ M ヌクレオチド4 - 1.750 μ M	ヌクレオチド1 - 1.750 μ M ヌクレオチド5 - 1.750 μ M	ヌクレオチド1 - 1.750 μ M ヌクレオチド6 - 1.750 μ M

[0038] (2) Measurement : performing a hybridization reaction in 15 degrees C using Sample A, Sample B, above-mentioned Sample C, and above-mentioned Sample D, aging measurement with an absorbance of 260nm was performed and the result was summarized to drawing 5 . Moreover, from the inclination of the plot of an absorbance to hybridization reaction time, relative initial velocity was calculated and it was shown in drawing 6 .

[0039] (3) Result consideration : compared with the technique shown in an example 2, that rate of reaction increases sharply, and further, the detection sensitivity of a mismatch also becomes high and can detect the technique of this example to a mismatch part so that I may be understood from the result shown in drawing 5 and drawing 6 . That is, a full match has remarkably large hybridization initial velocity compared with which mismatch. furthermore, the direction (13 place—1+ON4, 7 place—1+ON6) which has a mismatch part at least right in the middle in a mismatch with a different part — an end — it is (1 place—1+ON5) — it compares, and initial velocity is large, the rates of reaction of hybridization differ according to the location of a mismatch, and the part of the mismatch in an abnormality gene can also be detected using this result.

[0040]

[Effect of the Invention] If this invention is followed so that clearly from the above explanation, the reversed micelle by which an object gene and its probe were incorporated can be prepared, and very easy actuation of measuring advance of a hybridization reaction in this reversed micelle with a means like ultraviolet extinction equipment can detect not only the existence or nonexistence of the mismatch based on an abnormality gene but a mismatch part. In this way, this invention offers the detection approach of an abnormality gene of having excelled very much in the insurance and the convenience of the actuation, detection sensitivity, cost, etc., compared with the gene detecting method learned from the former.

[0041]

[Layout Table] SEQUENCE-LISTING<110> UIP Co. Ltd.<120> Method for detecting abnormal genes<130> P0405T<160> 6<210> 1<211> 20<212> DNA<213> Homo sapiens<400> 1gctttgaggt gcgtgtttgt<210> 2<211> 20<212> DNA<213> Homo sapiens<400> 2cgaaactcca cgcacaaaca<210> 3<211> 20<212> DNA<213> Artificial sequence<400> 3cgaaactcca cgaacaaaca<210> 4<211>

.20 <212> DNA <213> Artificial sequence <400> 4 cgaaactcca cgtacaaaca <210> 5 <211> 20
<212> DNA <213> Artificialsequence <400> 5 tgaaactcca cgcacaaaca <210> 6 <211> 20 <212>
DNA <213> Artificial sequence <400> 6 cgaaacccca cgcacaaaca

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-171988

(P 2 0 0 2 - 1 7 1 9 8 8 A)

(43) 公開日 平成14年6月18日 (2002. 6. 18)

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	ターマコード (参考)
C12N 15/09	ZNA	C12Q 1/68	A 4B024
C12Q 1/68		C12N 15/00	ZNA A 4B063

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願2000-374098 (P 2000-374098)

(22) 出願日 平成12年12月8日 (2000. 12. 8)

(71) 出願人 800000035

株式会社産学連携機構九州

福岡県福岡市東区箱崎6丁目10番1号

(72) 発明者 後藤 雅宏

福岡県福岡市西区生松台2-41-5

(72) 発明者 朴 連春

福岡県福岡市東区香椎浜4-5-9

(72) 発明者 古崎 新太郎

神奈川県藤沢市大鋸1-7-7

(74) 代理人 100087675

弁理士 筒井 知

F ターム (参考) 4B024 AA11 BA80 CA01 CA09 HA12

4B063 QA01 QA17 QQ42 QR32 QR52

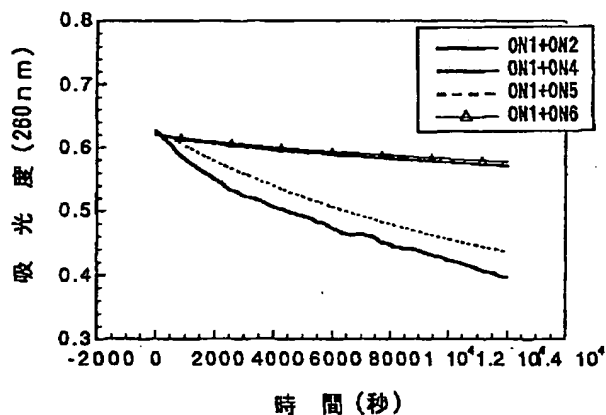
QR55 QS34 QX02

(54) 【発明の名称】 異常遺伝子の検出方法

(57) 【要約】

【課題】 遺伝子診断に用いられる簡便で高感度に異常遺伝子を検出することができる新しい技術を提供する。

【解決手段】 逆ミセルの中で、正常遺伝子の塩基配列を有する核酸オリゴマーに、該塩基配列に相補的な塩基配列を有するプローブをハイブリダイゼーションさせ；さらに、別の逆ミセルの中で、前記正常遺伝子の塩基配列を有する核酸オリゴマーに、該塩基配列の一部が変異した異常遺伝子の塩基配列に相補的なプローブをハイブリダイゼーションさせ；これらのハイブリダイゼーション反応の速度を測定してその差を調べて異常遺伝子を検出する。ハイブリダイゼーション反応の速度の測定は、例えば、紫外領域における吸光度の変化を測定することにより行う。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 逆ミセルの中で、正常遺伝子の塩基配列を有する核酸オリゴマーに、該塩基配列に相補的な塩基配列を有するプローブをハイブリダイゼーションさせ、さらに、別の逆ミセルの中で、前記正常遺伝子の塩基配列を有する核酸オリゴマーに、該塩基配列の一部が変異した異常遺伝子の塩基配列に相補的なプローブをハイブリダイゼーションさせ、これらのハイブリダイゼーション反応の速度を測定してその差を調べることを特徴とする異常遺伝子の検出方法。

【請求項2】 逆ミセル内に、正常遺伝子の塩基配列を有する核酸オリゴマーを注入し、さらに、同じ逆ミセル内に、正常遺伝子の塩基配列に相補的な塩基配列を有するプローブまたは異常遺伝子の塩基配列に相補的な塩基配列を有するプローブを注入して、ハイブリダイゼーション反応を行わせることを特徴とする請求項2の異常遺伝子の検出方法。

【請求項3】 紫外領域における吸光度の変化を測定することによってハイブリダイゼーション反応の速度を測定することを特徴とする請求項1または請求項2の異常遺伝子の検出方法。

【請求項4】 260nmにおける吸光度を測定することを特徴とする請求項3の異常遺伝子の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、異常遺伝子を検出するための新規な方法に関する。

【0002】

【従来の技術】1980年代の終わりにスタートしたヒトゲノム計画も21世紀の初頭には終了を迎え、30億に及ぶヒトの全塩基配列が決定されるとともに、ヒトのもつ約10万個と言われる遺伝子が明らかにされつつある。このようにして、遺伝病の原因となる多くの遺伝子や生体内において様々な生体機能に関わる遺伝子が解明されてくると、その異常を検出して疾病を予測し、その予防や治療に反映することのできる遺伝子診断がますます重要になってくる。

【0003】遺伝子診断に従来より主として採用されている方法は、正常遺伝子と異常遺伝子に、それぞれの遺伝子に対応するプローブ（オリゴヌクレオチド）をハイブリダイゼーションさせ、その結果をゲル電気泳動で分析して異常遺伝子を検出しようとするものである。しかし、この方法は、プローブを放射性同位元素、蛍光色素、酵素等で標識化することが必要であるため、操作が複雑であり、安全性、コスト、自動化等の面で不利な点が多い。また、ハイブリダイゼーション反応は水中で行われ、その反応速度は水溶液中のDNAの濃度等に依存するが、従来の方法においては、反応を最適に進行させるよう反応速度を制御し得るような反応場でハイブリダ

イゼーションが行われているわけではない。したがって、従来の方法には、用いられる遺伝子サンプルやプローブに制限があり、また、検出感度も限られている等の欠点があった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、遺伝子診断に用いられる簡便で高感度に異常遺伝子を検出することができる新しいタイプの技術を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者は、研究を重ねた結果、逆ミセル中に対象遺伝子とそのプローブを取り込み、逆ミセルをそれらのハイブリダイゼーションの反応場にしてハイブリダイゼーション反応の速度をモニターすることにより、上記の目的を達成し得ることを見出した。

【0006】かくして、本発明は、逆ミセルの中で、正常遺伝子の塩基配列を有する核酸オリゴマーに、該塩基配列に相補的な塩基配列を有するプローブをハイブリダイゼーションさせ；さらに、別の逆ミセルの中で、前記正常遺伝子の塩基配列を有する核酸オリゴマーに、該塩基配列の一部が変異した異常遺伝子の塩基配列に相補的なプローブをハイブリダイゼーションさせ；これらのハイブリダイゼーション反応の速度を測定してその差を調べることから成る異常遺伝子の検出方法を提供するものである。

【0007】本発明の方法の好ましい態様においては、逆ミセル内に、正常遺伝子の塩基配列を有する核酸オリゴマーを注入し、さらに、同じ逆ミセル内に、正常遺伝子の塩基配列に相補的な塩基配列を有するプローブまたは異常遺伝子の塩基配列に相補的な塩基配列を有するプローブを注入して、ハイブリダイゼーション反応を行わせる。

【0008】本発明の方法においては、紫外領域における吸光度の変化を測定することによってハイブリダイゼーション反応の速度を測定することが好ましく、特に、260nmにおける吸光度を測定することが好ましい。

【0009】

【発明の実施の形態】本発明の方法は、ナノ分子集合体である逆ミセルの内部を核酸のハイブリダイゼーションの反応場にし、その反応速度を測定することによって異常遺伝子を検出するものである。このような逆ミセルを利用する遺伝子の動力的検出法は、これまでになく新しい方法であり、次のような検出原理に基づいている。

【0010】(1)核酸のハイブリダイゼーションは、互いの塩基配列の相補性が高いものほど迅速に進行してハイブリッドを形成する。したがって、塩基対にミスマッチがあると、ハイブリダイゼーションの速度およびハイブリッドの熱安定性が低下し、この低下は塩基対にお

けるミスマッチの数およびミスマッチの位置に依存する。かくして、本発明に従えば、逆ミセル中で異常遺伝子と正常遺伝子のハイブリダイゼーションの速度を比較することによって異常遺伝子に含まれているミスマッチの数および位置(部位)を評価することができ、異常遺伝子の検出が可能となる。

【0011】(2)本発明においては、核酸のハイブリダイゼーションの反応場を逆ミセル中に移しているの
で、逆ミセルの粒径(大きさ)、数、逆ミセルの形成様
式等を変化させることにより、ハイブリダイゼーション
10 の速度を最適に制御できる。

【0012】(3)核酸はミセル中で濃縮されるため、
通常の水媒体中ではハイブリッドの形成が不可能な希薄
な条件下でも、ミセル中ではハイブリダイゼーションが
可能となり、異常遺伝子の高感度検出が可能となる。

【0013】上記のごとき原理に基づく本発明の方法を
実施するに当っては、逆ミセルの中で、正常遺伝子の塩
基配列を有する核酸オリゴマー(オリゴヌクレオチド)
に、該塩基配列に相補的な塩基配列を有するプローブ
(オリゴヌクレオチド)をハイブリダイゼーションさせ
20 る。さらに、別の逆ミセルの中で、前記正常遺伝子の塩
基配列を有する核酸オリゴマー(オリゴヌクレオチド)
に、該塩基配列の一部が変異した異常遺伝子の塩基配
列に相補的なプローブ(オリゴヌクレオチド)をハイブリ
ダイゼーションさせる。そして、これらのハイブリダイ
ゼーション反応の速度を測定してその差を調べることに
よって異常遺伝子を検出する。

【0014】ここで、逆ミセルとは、よく知られている
ように、有機媒体中で高秩序に自己形成される分子集合
体であり、具体的には、界面活性剤分子が、有機溶媒中
30 で、その親水部(親水性の官能基または原子団)を内側
にし、疎水部を外側(有機溶媒側)にして形成されるほ
ぼ球状の分子集合体である。

【0015】このような逆ミセル中でのハイブリダイゼ
ーションは、幾つかの様式で行うことができる。例え
ば、正常遺伝子の塩基配列を有する核酸オリゴマーを注
入した逆ミセルと、該塩基配列に相補的な塩基配列を有
するプローブを注入した逆ミセルとを混合することによ
って両逆ミセルが融合して形成される逆ミセル内でハイ
ブリダイゼーションを進行させる。同様に、正常遺伝子
40 の塩基配列を有する核酸オリゴマーを注入した逆ミセル
と、該塩基配列の一部が変異した異常遺伝子の塩基配
列に相補的なプローブを注入した逆ミセルとを混合する
ことによって両逆ミセルが融合して形成される逆ミセル
内でハイブリダイゼーションを進行させる。そして、これ
らの逆ミセル中でのハイブリダイゼーションの反応速度
を測定してその差を調べる。この方法は、異常遺伝子に
因るミスマッチの存否を検出するには有効であるが、一
般に、ミスマッチの位置までを判定するには時間がかか
る(後述の実施例2参照)。

【0016】そこで、本発明の好ましい態様に従えば、
逆ミセル内に、正常遺伝子の塩基配列を有する核酸オリ
ゴマーを注入し、さらに、同じ逆ミセル内に、正常遺伝
子の塩基配列に相補的な塩基配列を有するプローブを注
入する。同様にして、別の逆ミセル内に、正常遺伝子の
塩基配列を有する核酸オリゴマーを注入し、さらに、同
じ逆ミセル内に、異常遺伝子の塩基配列に相補的な塩基
配列を有するプローブを注入する。そして、これらの逆
ミセル中でハイブリダイゼーションを行わせて、反応速
度を測定しその差を調べる。この方法によれば、オリゴ
ヌクレオチドが直接接触するのでハイブリダイゼーショ
ン反応速度が増大され、ミスマッチの存否のみならず、
ミスマッチの位置までも検出することが可能となる(後
述の実施例3参照)。

【0017】正常遺伝子の核酸オリゴマーまたはプロー
ブの逆ミセルへの注入は、それらのオリゴヌクレオチド
を生理的条件下に近似するpHとイオン強度を有するよ
うに調整したバッファー液に溶かした水溶液の状態で行
う。また、異常遺伝子の塩基配列に相補的なプローブ
は、検出対象となる二本鎖の核酸を、よく知られている
ように、高アルカリ性に供するかまたは加熱することに
よって一本鎖の核酸とすることによって得られる。

【0018】なお、本発明が対象とする核酸とは、一般
的にはDNAであるが、本発明は、mRNAのようなR
NAから成る遺伝子の分析にも適用できる。したがっ
て、本発明に関して用いられるハイブリダイゼーション
という語は、DNA-DNAハイブリッドが形成される
場合のみならず、DNAとRNAのハイブリダイゼーショ
ンまたはRNAとRNAのハイブリダイゼーションも
含むものとする。

【0019】本発明において逆ミセルを形成するために
用いられる界面活性剤は、有機溶媒中で前述したような
分子集合体を自発形成し得るものであれば特に限定され
ず、親水部がイオン性(アニオン性、カチオン性または
両性)の界面活性剤または非イオン性の界面活性剤のい
ずれを用いることもできる。しかしながら、DNAなどの
核酸はアニオン性であるので、核酸が逆ミセルの内壁
と反発して該内壁に付着せずハイブリダイゼーションが
円滑に進むことから、アニオン性の界面活性剤を用いる
ことが好ましい。逆ミセルを形成するのに好ましい界面
活性剤の例としては、アニオン性界面活性剤であるAO
Tとして知られるジ-2-エチルヘキシルスルホコハク
酸ナトリウムの他、ジオレイルリン酸、ドデシルスルホ
ン酸ナトリウム、およびこれらの混合物等が挙げられる
が、これらに限られるものではない。また、これらの界
面活性剤から成る逆ミセルが形成される媒体として好ま
しい有機溶媒の例としては、イソオクタン、ヘキサン、
シクロヘキサン、ドデカン、トルエン、クロロホルム等
が挙げられるが、これらに限られるものではない。

50 【0020】本発明においては、以上のような界面活性

剤を W_0 (水/界面活性剤のモル比)として、一般に5~50になるような割合で用いる。 W_0 は逆ミセルの大きさ(粒径)を支配する数値であり、ハイブリダイゼーションするオリゴヌクレオチドが長い程、 W_0 が大きくなるような逆ミセルを形成させるのが好ましい。

【0021】本発明の方法は、一般に、15~50の塩基から成るオリゴヌクレオチドをハイブリダイゼーションさせ異常遺伝子を検出するのに適しているが、これよりも長いオリゴヌクレオチド(例えば100塩基)にも本発明を適用することはできる。

【0022】逆ミセル中でのハイブリダイゼーションの反応速度は、ハイブリッド形成による核酸の構造変化を検出することのできる手段、例えば、UV装置(紫外分光装置)、CD装置(円二色性スペクトル測定装置)、DSC装置(差走査熱量分析装置)などを用いて測定することができるが、取扱い易くハイブリダイゼーションによる構造変化を簡単に知ることができることから、UV装置を用いて紫外領域における吸光度の変化を測定することが好ましい。紫外領域における吸光度の測定は、例えば、260nmにおける吸光度を測定し、その吸光度の経時変化を観察することにより、ハイブリダイゼーション反応の進行を定性的に知ることができる。また、ハイブリダイゼーションの反応速度を定量的に評価するには、例えば、ハイブリダイゼーション反応時間に対する吸光度のプロットの傾きから、相対的な初速度を求めればよい。

【0023】

【実施例】以下に、本発明の特徴をさらに具体的に明らかにするため実施例を示すが、本発明は、これらの実施例によって制限されるものではない。

実施例1: 予備実験

本発明の異常遺伝子の検出方法における測定条件を決定するため、予め、水溶液中でのハイブリダイゼーション挙動を検討した。

(1) サンプルDNA: 以下に示す配列を有する20塩基の合成オリゴヌクレオチド(以下、単にヌクレオチドまたはONと記すことがある)を用いて、フルマッチDNAとミスマッチDNAのハイブリダイゼーションを行った。なお、 ϵ は260nmにおける吸光係数である。

p53癌抑制遺伝子(正常遺伝子)

ヌクレオチド1: 5'-GCTTTGAGGTGCGTGTGT-3' (配列番号: 1) (ϵ 183100 M cm^{-1})

p53癌抑制遺伝子と相補配列をもつプローブ

ヌクレオチド2: 5'-CGAACTCCACGCACAAACA-3' (配列番号: 2) (ϵ 197300 M cm^{-1})

p53癌抑制遺伝子の13位に変異がある異常遺伝子

ヌクレオチド3: 5'-CGAACTCCACGAACAAACA-3' (配列番号: 3) (ϵ 203100 M cm^{-1})

ヌクレオチド4: 5'-CGAACTCCACGTACAAACA-3' (配列番号: 4) (ϵ 200600 M cm^{-1})

p53癌抑制遺伝子の1位に変異がある異常遺伝子

ヌクレオチド5: 5'-TGAACTCCACGCACAAACA-3' (配列番号: 5) (ϵ 198300 M cm^{-1})

p53癌抑制遺伝子の7位に変異がある異常遺伝子

ヌクレオチド6: 5'-CGAACTCCACGCACAAACA-3' (配列番号: 6) (ϵ 196400 M cm^{-1})

【0024】これらのオリゴヌクレオチドの二次構造を確認するため、それぞれの配列から最小スタッキング長(Minimum Stacking Length)と最小自由エネルギー(Minimum Free Energy)を計算したところ、以下に示すような結果から、これらのオリゴヌクレオチドは水溶液中で通常的一本鎖を形成していることを確認した。

ヌクレオチド1: 最小スタッキング長: 2; 最小自由エネルギー: 0.29Kcal/mol

ヌクレオチド2: 最小スタッキング長: 2; 最小自由エネルギー: 1.59Kcal/mol

ヌクレオチド3: 最小スタッキング長: 2; 最小自由エネルギー: 1.59Kcal/mol

ヌクレオチド4: 最小スタッキング長: 2; 最小自由エネルギー: 1.59Kcal/mol

ヌクレオチド5: 最小スタッキング長: 2; 最小自由エネルギー: 1.90Kcal/mol

ヌクレオチド6: 最小スタッキング長: 2; 最小自由エネルギー: 1.59Kcal/mol

【0025】(2) ハイブリダイゼーション速度に対する温度の影響: 互いに相補的なフルマッチハイブリダイゼーションのDNAサンプルとして、10mM Tris、1mM EDTA (2Na)、100mM NaCl、2.017 μ Mヌクレオチド1、2.057 μ Mヌクレオチド2、pH7.0から成るサンプルを用い、測定温度を25、15、10、15、25、35、65、25 $^{\circ}$ Cに変えながら、260nmにおける吸光度の時間変化を測定した。その結果を図1に示す。図1に示されるように、温度が低ければ低いほど、260nmでの吸光度が小さいことから、このハイブリダイゼーション反応は、温度が低いほど早く行われることがわかった。この結果に基づき、操作の容易性も考慮し、以後のハイブリダイゼーション反応温度は15 $^{\circ}$ Cに設定することにした。

【0026】(3) ハイブリッド形成速度における1価の陽イオン濃度の影響: 下記に示すサンプルA、サンプルB、サンプルCおよびサンプルDをそれぞれ1mlずつ用い、測定温度15 $^{\circ}$ Cにおいて、200nmから800nmの領域の吸収スペクトルを測定した。

サンプルA: 10mM Tris、1mM EDTA (2Na)、700mM NaCl、1.75 μ Mヌクレオチド1、1.75 μ Mヌクレオチド2 pH7.0

サンプルB: 10mM Tris、1mM EDTA (2Na)、700mM NaCl、1.75 μ Mヌクレオチド1、1.75 μ Mヌクレオチド4 pH7.0

サンプルC: 10mM Tris、1mM EDTA (2Na)、700mM NaCl、1.75 μ Mヌクレオチド1、1.75 μ Mヌクレオチド5 pH7.0

サンプルD: 10mM Tris、1mM EDTA (2Na)、700mM NaCl、1.75 μ Mヌクレオチド1、1.75 μ Mヌクレオチド6 pH7.0

【0027】その結果を図2に示す。図2に示したように、1価のナトリウム陽イオンが700mM存在するとき、フルマッチDNAであるON1+ON2と、ミスマッチDNAであるON1+ON4、ON1+ON5、ON1+ON6とは、その吸光度が類似していて、またそれぞれが一本鎖状態時の吸光度ともあまり変化がない。これから、上記条件下では、ハイブリダイゼーション反応が非常に遅く、また1価の陽イオン濃度は、上記条件下におけるハイブリダイゼーション反応速度への影響はほとんどないことがわかった。

【0028】ハイブリダイゼーション反応に影響を与える因子としては、この他に、オリゴヌクレオチドを溶かすバッファー（逆ミセル内部）のpH、逆ミセルが形成する有機溶媒の存在等が考えられるが、本発明の方法

20

は、遺伝子診断への利用であり、生理条件下での研究を前提としているため、pHの変化と有機溶媒の存在影響については検討しないことにした。

【0029】実施例2：逆ミセル間の融合によるハイブリダイゼーション

この実施例は、二つの逆ミセルにそれぞれ相補配列、あるいはミスマッチ配列のオリゴヌクレオチドを微量注入した後、二つの逆ミセルを混合し融合させて得られた逆ミセル内でハイブリダイゼーションを行わせて異常遺伝子を検出するものである。

【0030】(1) 逆ミセルの形成：50mM AOT / イソオクタン溶液3ml（有機相）に、10mM Tris、1mM EDTA (2Na)、pH7.0、198.043 μ Mヌクレオチド1溶液（水相）を54 μ l注入して、 $W_o=20$ の逆ミセルを形成させた（サンプルA）。同様にして、下記の表1に示すようにサンプルB～Eを調製した。

【0031】

【表1】

	有機相	水相	見かけのDNA濃度
サンプルA	界面活性剤 AOT 50 mM 溶媒 イソオクタン	10 mM Tris, 1mM EDTA(2Na), pH7.0, 198.0 μ Mヌクレオチド1	3.500 μ M
サンプルB	界面活性剤 AOT 50 mM 溶媒 イソオクタン	10 mM Tris, 1mM EDTA(2Na), pH7.0, 198.0 μ Mヌクレオチド2	3.500 μ M
サンプルC	界面活性剤 AOT 50 mM 溶媒 イソオクタン	10 mM Tris, 1mM EDTA(2Na), pH7.0, 198.0 μ Mヌクレオチド4	3.500 μ M
サンプルD	界面活性剤 AOT 50 mM 溶媒 イソオクタン	10 mM Tris, 1mM EDTA(2Na), pH7.0, 198.0 μ Mヌクレオチド5	3.500 μ M
サンプルE	界面活性剤 AOT 50 mM 溶媒 イソオクタン	10 mM Tris, 1mM EDTA(2Na), pH7.0, 198.0 μ Mヌクレオチド6	3.500 μ M

【0032】(2) 測定：サンプルA 1mlをUV装置のセルに入れ、測定温度15℃において、200nmから800nmの領域の吸収スペクトルを測定して、図3に示した。この結果、逆ミセル中にヌクレオチド1を注入したときの吸収スペクトル（吸光度）は、水溶液中と変わらなかった。これから、この条件の逆ミセル中で、オリゴヌクレオチドは変性せず、ミセル内に均一に取り込まれることが理解される。

【0033】サンプルA 0.5mlとサンプルB 0.5ml（フルマッチ）を混合し、15℃においてハイブリダイゼーション反応を開始させ、開始後、直ちに260nmでの吸光度の時間変化測定を行った。同様の方法で、サンプルA+サンプルC；サンプルA+サンプルD；サンプルA+サンプルEを用い、15℃においてハイブリダイゼーション反応をさせながら吸光度の時間変化測定を行った。その結果をまとめて図4に示す。

【0034】(3) 結果考察：図4に示すように、ハイブリダイゼーション反応の追跡を12000秒行った結果、オリゴヌクレオチドの塩基配列が互いに完全に相補

的なフルマッチであるON1+ON2は、ミスマッチであるON1+ON4、ON1+ON5、ON1+ON6に比べてハイブリッド形成速度が遥かに早い。すなわち、ハイブリダイゼーション反応を12000秒進行させたとき、フルマッチであるON1+ON2においては、多量のハイブリッドが形成されたが、ミスマッチが20塩基中の一カ所に存在するミスマッチの場合では、ハイブリッドの形成は未だ充分でない。このように、フルマッチとミスマッチとは、吸光度の経時変化に顕著な差があり、ミスマッチが存在することは検出できるが、上記のハイブリダイゼーション反応時間（12000秒）では、異なるミスマッチ部位をもつON1+ON4、ON1+ON5、ON1+ON6においてはその差が類似していて、ミスマッチ部位の検出まで及ばなかった。

【0035】実施例3：オリゴヌクレオチドの直接接触によるハイブリダイゼーション

この実施例は、一つの逆ミセルに一種類のオリゴヌクレオチドを微量注入した後、この配列と相補配列あるいは

50

ミスマッチ配列をもつオリゴヌクレオチドを更に微量注入し、両オリゴヌクレオチドを直接接触させながら、ハイブリダイゼーション反応を行うことにより異常遺伝子を検出する例を示すものである。

【0036】(1) 逆ミセルの形成：50 mM AOT / イソオクタン溶液 (有機相) 1 ml に、10 mM Tris、1 mM EDTA (2Na)、pH 7.0、198.0 μ Mヌクレオチド1溶液 (水相) を9 μ l 注入して、 $W_o = 10$ の逆ミセルを形成させた。これに、10 mM

Tris、1 mM EDTA (2Na)、pH 7.0、198.0 μ Mヌクレオチド2溶液をさらに9 μ l 注入して最終的に $W_o = 20$ の逆ミセル (サンプルA) を調製し、直ちに測定に用いた。測定温度は15℃である。同様に、次の表2に示すようなサンプルB～Dを調製し、測定を行った。

【0037】

【表2】

	サンプルA	サンプルB	サンプルC	サンプルD
有機相	界面活性剤 AOT 50 mM 溶媒 イソオクタン	界面活性剤 AOT 50 mM 溶媒 イソオクタン	界面活性剤 AOT 50 mM 溶媒 イソオクタン	界面活性剤 AOT 50 mM 溶媒 イソオクタン
水相/ $W_o=10$	10 mM Tris, 1mM EDTA (2Na), pH7.0, 198.0 μ M ヌクレオチド1	10 mM Tris, 1mM EDTA (2Na), pH7.0, 198.0 μ M ヌクレオチド1	10 mM Tris, 1mM EDTA (2Na), pH7.0, 198.0 μ M ヌクレオチド1	10 mM Tris, 1mM EDTA (2Na), pH7.0, 198.0 μ M ヌクレオチド1
見かけの DNA 濃度	ヌクレオチド1 - 1.765 μ M	ヌクレオチド1 - 1.765 μ M	ヌクレオチド1 - 1.765 μ M	ヌクレオチド1 - 1.765 μ M
添加剤/ $W_o=20$	10 mM Tris, 1mM EDTA (2Na), pH7.0, 198.0 μ M ヌクレオチド2	10 mM Tris, 1mM EDTA (2Na), pH7.0, 198.0 μ M ヌクレオチド4	10 mM Tris, 1mM EDTA (2Na), pH7.0, 198.0 μ M ヌクレオチド5	10 mM Tris, 1mM EDTA (2Na), pH7.0, 198.0 μ M ヌクレオチド6
見かけの DNA 濃度	ヌクレオチド1 - 1.750 μ M ヌクレオチド2 - 1.750 μ M	ヌクレオチド1 - 1.750 μ M ヌクレオチド4 - 1.750 μ M	ヌクレオチド1 - 1.750 μ M ヌクレオチド5 - 1.750 μ M	ヌクレオチド1 - 1.750 μ M ヌクレオチド6 - 1.750 μ M

【0038】(2) 測定：上記のサンプルA、サンプルB、サンプルCおよびサンプルDを用い、15℃においてハイブリダイゼーション反応を行いながら、260 nmの吸光度の経時変化測定を行い、結果を図5にまとめた。また、ハイブリダイゼーション反応時間に対する吸光度のプロットの傾きから、相対的初速度を計算し、図6に示した。

【0039】(3) 結果考察：図5および図6に示す結果から理解されるように、この実施例の手法は、実施例2に示す手法に比べてその反応速度が大幅に増大され、さらにミスマッチの検出感度も高くなり、ミスマッチ部位まで検出できる。すなわち、フルマッチはいずれのミスマッチに比べ、ハイブリダイゼーション初速度が著しく大きい。さらに、異なる部位をもつミスマッチにおいては、ミスマッチ部位が真中ぐらいにある方 (13位 - ON1 + ON4、7位 - ON1 + ON6) が末端にある (1位 - ON1 + ON5) と比べて初速度が大きく、ミスマッチの位置に応じてハイブリダイゼーションの反応速度が異なり、この結果を利用して異常遺伝子におけるミスマッチの部位を検出することもできる。

【0040】

【発明の効果】以上の説明から明らかなように、本発明に従えば、対象遺伝子とそのプローブが取り込まれた逆ミセルを調製し、この逆ミセル中でのハイブリダイゼーション反応の進行を紫外吸光装置のような手段で測定するというきわめて簡単な操作により、異常遺伝子に因るミスマッチの存否のみならず、ミスマッチ部位も検出することができる。かくして、本発明は、従来から知られた遺伝子検出法に比べ、その操作の安全・便利性、検出感度、コスト等において非常に優れた異常遺伝子の検出方法を提供するものである。

【0041】

【配列表】SEQUENCE LISTING

<110> UIP Co. Ltd.
 <120> Method for detecting abnormal genes
 <130> P0405T
 <160> 6
 <210> 1
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 gctttgaggt gcgtgtttgt
 <210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 cgaaactcca cgcacaaaca
 <210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <400> 3
 cgaaactcca cgaacaaaca
 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <400> 4
 cgaaactcca cgtacaaaca
 <210> 5

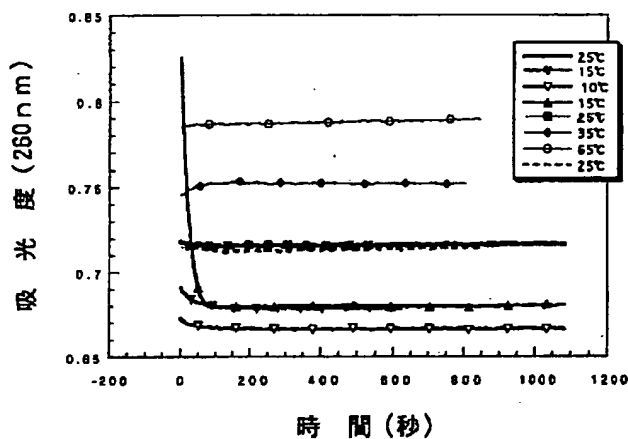
<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <400> 5
 tgaaactcca cgcacaaaca
 <210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <400> 6
 cgaaacccca cgcacaaaca

【図面の簡単な説明】

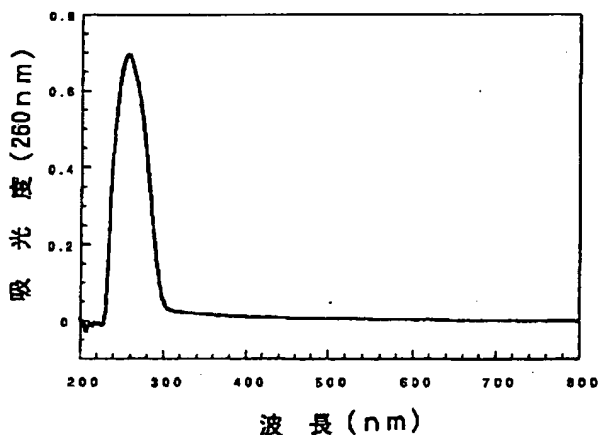
【図1】水溶液中のハイブリダイゼーションにおける温度の影響を調べるために行った吸光度の経時変化測定の結果を示す。

【図2】水溶液中のハイブリダイゼーションにおける陽

【図1】



【図3】



イオン濃度の影響を調べるために行った紫外吸収スペクトル測定の結果を示す。

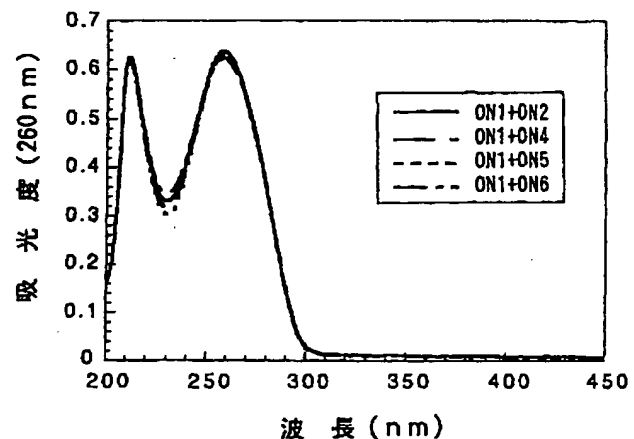
【図3】ヒトのp53癌抑制遺伝子に由来するオリゴヌクレオチドの逆ミセル中での紫外吸収スペクトル測定の結果を示す。

【図4】本発明に従い異常遺伝子を検出するために、フルマッチのオリゴヌクレオチドおよびミスマッチのオリゴヌクレオチドの逆ミセル中のハイブリダイゼーションによる吸光度の経時変化を測定した結果を示す。

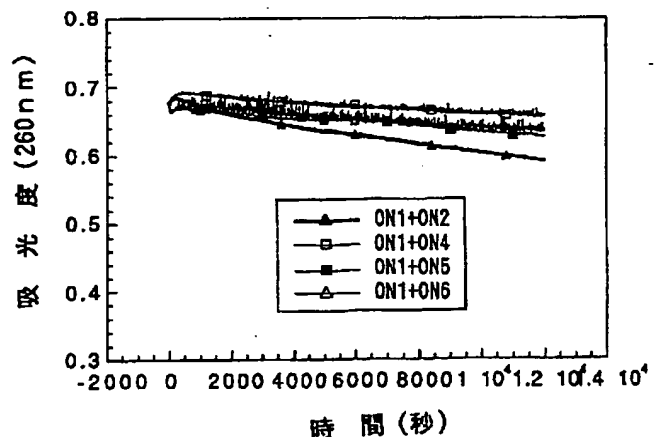
10 【図5】本発明に従い異常遺伝子を検出するために、フルマッチのオリゴヌクレオチドおよびミスマッチのオリゴヌクレオチドの逆ミセル中のハイブリダイゼーションによる吸光度の経時変化を測定した別の結果を示す。

【図6】本発明に従い異常遺伝子を検出するために、逆ミセル中のハイブリダイゼーション初速度とミスマッチの位置との相関関係を求めた結果を示す。

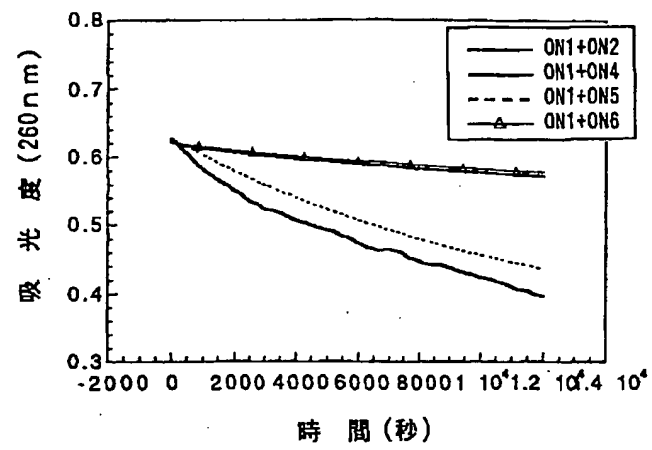
【図2】



【図4】



【図 5】



【図 6】

